

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Maja Grgurić

**VALIDACIJA UREĐAJA ZA
AUTOMATSKU SEDIMENTACIJU
ERITROCITA *iSED ALCOR*
*SCIENTIFIC***

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Maja Grgurić

**VALIDACIJA UREĐAJA ZA
AUTOMATSKU SEDIMENTACIJU
ERITROCITA *iSED ALCOR*
*SCIENTIFIC***

Završni rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku u sklopu Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sci. Vatroslav Šerić, spec. med. biochem.

Rad ima 24 lista, 4 tablice i 9 slika.

Zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sci. Vatroslavu Šeriću na mentorstvu i pruženoj pomoći.

*Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za kliničku laboratorijsku dijagnostiku na pomoći
tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.*

*Veliko hvala mojoj obitelji na razumijevanju, podršci, ohrabrivanju i motivaciji tijekom
studiranja i izrade završnog rada.*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Validacija analitičke metode	1
1.2. Krv	2
1.2.1. Eritrociti	3
1.2.2. Sedimentacija eritrocita	3
2. HIPOTEZA	6
3. CILJEVI	7
4. MATERIJAL I METODE	8
4.1. Ustroj studije	8
4.2. Materijal	8
4.3. Metode	8
4.3.1. Westergren metoda	8
4.3.2. Automatski uređaj <i>iSED Alcor Scientific</i>	10
4.4. Statističke metode	11
5. REZULTATI	12
5.1. Usporedba dobivenih rezultata brzine sedimentacije eritrocita standardnom Westergren metodom (WG) i metodom na automatskom uređaju <i>iSED Alcor Scientific (iSED)</i>	12
5.1.1. Rezultati usporedbe standardne Westergren metode i metode na automatskom uređaju <i>iSED Alcor Scientific</i> pomoću Passing Bablok regresijske analize i koeficijenta korelacije metoda	14
6. RASPRAVA	17
7. ZAKLJUČAK	19
8. SAŽETAK	20

9. SUMMARY	21
10. LITERATURA	22
11. ŽIVOTOPIS	24

1. UVOD

1.1. Validacija analitičke metode

Validacija metode postupak je kojim se dokazuje prikladnost analitičke metode za određenu namjenu. Validacija podrazumijeva skup testova koji ispituju pretpostavke na kojima se temelji analitička metoda te se utvrđuju i dokumentiraju karakteristike izvedbe metode (1). Validacijom se dokazuje da određena metoda služi svrsi za koju je namijenjena. Provodi se prije primjene nove ili modificirane metode, a provodi je proizvođač. Kod svakog procesa validacije važno je definirati radne značajke metode, odnosno parametre validacije i odrediti kriterije njihove prihvatljivosti (2). Radne značajke metode jesu:

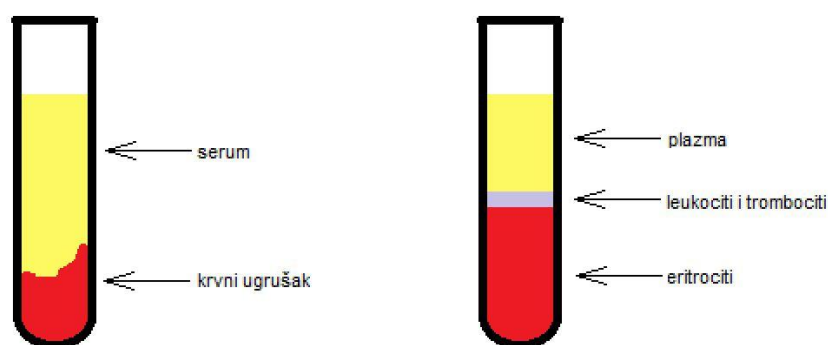
- linearnost (engl. *linearity*)
- preciznost (engl. *precision*)
 - ponovljivost (engl. *repeatability*)
 - međupreciznost (engl. *intermediate precision*)
 - reproducibilnost (engl. *reproducibility*)
- istinitost (engl. *trueness*)
- selektivnost (engl. *selectivity*)
- granica detekcije (engl. *limit of detection*, LOD)
- granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification*, LOQ)
- robusnost metode (engl. *ruggedness*) (2).

Pri provođenju validacije nije potrebno uzeti u obzir sve parametre validacije, već se odabiru različite radne značajke ovisno o metodi koju se validira. Stoga, validacija može biti potpuna i djelomična ovisno o tome uzimaju li se sve radne značajke u obzir ili samo neke. Potpuna validacija provodi se kod razvoja nove metode ili kod prenamjene postojeće metode, dok se djelomična validacija provodi kod poboljšanja ili prilagodbe postojeće metode, promjene u sintezi proizvoda ili kod prenošenja metode na drugi instrument (3). Prvi je korak u procesu validacije metode odrediti svrhu metode, zatim odabrati prikladne radne značajke, postaviti kriterije prihvatljivosti, napraviti laboratorijske analize, obraditi podatke i usporediti ih s kriterijima prihvatljivosti (1).

1.2. Krv

Krv je tjelesna tekućina crvene boje koja protječe krvožilnim sustavom ljudskog organizma i putuje do raznih tkiva. Sastoji se od krvne plazme, krvnih stanica i krvnih pločica. Krv je najvažnija tjelesna tekućina u ljudskom organizmu, budući da osigurava prijenos kisika i hranjivih tvari svim stanicama u organizmu; pomoću leukocita brani organizam od mnogih patogena te odnosi štetne tvari koje su produkti metabolizma stanica (4).

Krvna plazma tekući je dio krvi u kojem plivaju krvne stanice i različite druge biološki važne tvari te čini približno 50-55% volumena krvi (4,5). Najveći dio plazme čini voda (4). Plazma se dobiva uklanjanjem krvnih stanica centrifugiranjem pune krvi nakon što se doda određeni antikoagulans (Slika 1.). Krvni serum žućkasta je vodena faza krvi, koja se odvaja od krvnog ugruška nakon što se punu krv ostavi da stoji najmanje 30 minuta (4,6). U plazmi i serumu pronalazimo proteine i peptide, ugljikohidrate, lipide, aminokiseline, elektrolite, organske otpadne tvari i druge otopljene organske molekule. Međutim, ove dvije vodene otopine međusobno se razlikuju u koncentracijama navedenih analita (5). Primjerice, koncentracija ukupnih proteina manja je u serumu, dok su koncentracije kalija, anorganskog fosfata, laktata ili amonijaka veće u serumu nego u plazmi zbog lize stanica, većinom eritrocita (6). Proteini plazme zaduženi su za održavanje koloidno-osmotskog tlaka, sudjeluju u imunološkim reakcijama, prijenosu biološki važnih tvari i u procesu zgrušavanja ili sprječavanja pretjeranog zgrušavanja krvi (4).



Slika 1. Krvni serum i krvna plazma

Od krvnih stanica razlikujemo crvene krvne stanice ili eritrocite, bijele krvne stanice ili leukocite i krvne pločice ili trombocite. Glavna funkcija eritrocita je prijenos hemoglobina, koji će prenijeti kisik iz pluća u tkiva (7). Leukociti su stanice s jezgrom koje nam služe u obrani organizma od različitih stranih tvari, mikroba i zaraznih bolesti (8). Pokretači su zaštitnog sustava tako da se većina leukocita prenosi u područja infekcije i upale te brane organizam od zaraznog uzročnika (7). Trombociti su stanice bez jezgre koje su u cirkulaciji uključene u proces hemostaze, odnosno u proces zaustavljanja krvarenja (4). Osnovna funkcija trombocita je sprječavanje prekomjernog krvarenja agregacijom trombocita, odnosno stvaranjem tromba (9).

1.2.1. Eritrociti

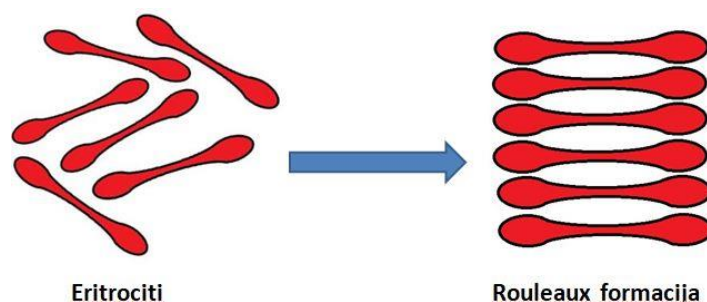
Zreli eritrociti su crvene krvne stanice bikonkavnog oblika, elastični su i bez jezgre, što omogućuje nesmetano provlačenje kroz uske krvne žile (4). Stvaranje eritrocita regulirano je stupnjem oksigenacije tkiva. Za sazrijevanje eritrocita važni su vitamin B12 i folna kiselina jer su oba nužna za stvaranje deoksiribonukleinske kiseline (DNA) (7). Životni vijek eritrocita iznosi 120 dana, nakon čega ih tkivni makrofagi uklanjaju (4).

Eritrociti se sastoje od stanične membrane i citoplazme. U lipidnom dvosloju, koji je sastavljen od kolesterola, fosfolipida i glikolipida, nalaze se strukturni i kontraktilni proteini kao što su spektrin, aktin, ankirin, zatim enzimi i površni antigeni (4). Glikokaliks prekriva eritrocite izvana te je izgrađen od ugljikohidrata i glikolipida. Od ugljikohidrata najviše je zastupljen negativno nabijeni šećer sijalinska kiselina (10). Vjeruje se da su membrane eritrocita negativno nabijene upravo zbog sijalinske kiseline, koja se nalazi na samom kraju glikanskih lanaca, zbog čega se eritrociti odbijaju i stabilni su u otopini (10,11). U citoplazmi eritrocita nalaze se proteini, od kojih najvećim dijelom hemoglobin, ali i enzimi i elektroliti (4).

1.2.2. Sedimentacija eritrocita

Sedimentacija eritrocita test je kojim se mjeri brzina taloženja krvnih stanica na dno epruvete pod utjecajem gravitacije. Budući da postoji razlika u gustoći eritrocita i plazme, gdje je gustoća eritrocita veća od gustoće plazme, eritrociti će pasti na dno epruvete i potisnuti

plazmu prema gore (10). Eritrociti ne padaju pojedinačno, već tvore tzv. *rouleaux* formacije koje izgledaju kao naslagani novčići.



Slika 2. Tvorba *rouleaux* formacije eritrocita

Kao što je prethodno spomenuto, eritrociti imaju negativan naboj i međusobno se odbijaju, dok su mnogi proteini plazme pozitivnog naboja. Njihov pozitivan naboj neutralizira površinski naboj eritrocita te tako dolazi do agregacije eritrocita. Zbog toga će povećanje proteina plazme biti povezano s višom stopom sedimentacije eritrocita (12). Od proteina plazme na agregaciju najviše utječe fibrinogen, zatim pojedine globulinske frakcije, dok povećana koncentracija albumina usporava sedimentaciju (4,12). Neke studije ukazuju na postojanje i drugih čimbenika, koji mogu utjecati na proces agregacije eritrocita, kao što su veličina, struktura i broj eritrocita, temperatura, velika molekulska masa komponenata u plazmi te viskoznost krvi (12,13,14). Tvari koje nastaju prilikom patološkog procesa u organizmu (imuni kompleksi, proteini akutne faze, imunoglobulini) vežu se na membranu eritrocita u prisutnosti fibrinogena. Na taj način smanjuju negativan naboj, potiču veću agregaciju eritrocita te povećavaju brzinu sedimentacije eritrocita (4). Stopa sedimentacije eritrocita izravno je proporcionalna masi eritrocita, ali obrnuto proporcionalna površini samog eritrocita. Makrociti se sedimentiraju brže od normalnih stanica i mikrocita (12).

Sedimentacija eritrocita ubrzana je kod akutnih i kroničnih infektivnih stanja, reumatskih bolesti, neoplastičnih sindroma i degenerativnih bolesti, ali je fiziološki lagano povećana i kod osoba starije dobi te trudnica (4,15). Snižena brzina sedimentacije eritrocita može se javiti kao posljedica kongestivnog zatajenja srca, hipofibrinogenemije, leukocitoze, policitemije i anemije srpastih stanica (15). Referentne vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita za određivanje sedimentacije metodom po Westergrenu i automatiziranom metodom prikazane su u tablici 1 (16).

Tablica 1. Referentne vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita za standardnu Westergren metodu i automatiziranu metodu

Jedinica	REFERENTNI INTERVAL		
	SPOL	DOB	INTERVAL
mm/3,6ks	muški, ženski	1d. – 7g.	0 – 20
	muški	8 – 14g.	2 – 21
	muški	15 – 19g.	2 – 12
	muški	20 – 50g.	2 – 13
	muški	>50	3 – 23
	ženski	8 – 19g.	2 – 20
	ženski	20 – 50g.	4 – 24
	ženski	>50	5 – 28

2. HIPOTEZA

Metoda na automatskom uređaju *iSED Alcor Scientific* za određivanje brzine sedimentacije eritrocita identična je i kompatibilna sa standardnom Westergren metodom.

3. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja su bili sljedeći:

- ispitati i usporediti vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita dobivene na automatskom uređaju *iSED Alcor Scientific* s vrijednostima dobivenim standardnom laboratorijskom metodom
- ustanoviti djelotvornost ispitivanih metoda za određivanje brzine sedimentacije.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. USTROJ STUDIJE

Istraživanje je provedeno po načelu *cross-sectional* (presječne) studije. Studija može istraživati cijele populacije prikupljajući podatke u sadašnjosti ili kratkom vremenskom razdoblju i međusobno ih uspoređivati. Studijom se utvrđuje prevalencija neke bolesti ili nekog rizičnog čimbenika za razvoj bolesti. Koristi se često s obzirom na to da su troškovi studije manji i kratkog vremenskog trajanja (17).

4.2. MATERIJAL

U provedenom istraživanju analizirani su nasumični uzorci pacijenata različitih dobnih skupina (od 15 do 80 godina). Ukupno je obrađeno 50 uzoraka, od kojih 38 od muškaraca i 12 od žena. U istraživanju se iz uzoraka venske krvi određuju vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita standardnom laboratorijskom metodom i metodom na automatskom uređaju *iSED Alcor Scientific*. Uzorci ne smiju imati ugrušak niti biti hemolizirani (uzorak krvi se ne smije jako miješati). Krv se može uzorkovati u bilo koje vrijeme bez obzira je li pacijent bio natašte ili nije. Pretraga se mora obaviti unutar 2 sata od uzimanja uzorka ili unutar 6 sati ako se krv drži na +4°C.

4.3. METODE

4.3.1. Westergren metoda

Kao zlatni standard za određivanje brzine sedimentacije eritrocita koristi se metoda po Westergrenu, koja se temelji na očitavanju visine stupca plazme iznad istaloženih eritrocita.

Postupak analize uzorka: Uzorak venske krvi izvadi se u *Vacutainer* epruvetu s crnim čepom u kojoj se nalazi natrijev citrat kao antikoagulans (Slika 3.). Sadržaj epruvete se rukom lagano promiješa.



Slika 3. *Vacutainer* epruveta s antikoagulansom natrijevim citratom

Westergren cjevčica (Slika 4.) skalirana je staklena cijev otvorena na oba kraja, duljine 30 cm i promjera 2,5 mm s oznakom 0 pri vrhu i 200 pri dnu. Na donjem dijelu cjevčice nalazi se gumeni prsten koji prilikom umetanja u *Vacutainer* epruvetu stvara pozitivan tlak, koji potiskuje krv u cjevčicu do oznake 0.



Slika 4. Westergren cjevčica

Cjevčica se zajedno s *Vacutainer* epruветom stavi na stabilan stalak da stoji uspravno na konstantnoj sobnoj temperaturi, dalje od izvora svjetlosti i vibracija. Postavi se alarm na jedan sat (Slika 5.). Nakon toga se očita visina stupca plazme iznad istaloženih eritrocita i zabilježi rezultat.



Slika 5. Stalak s uspravno postavljenim Westergren cjevčicama

4.3.2. Automatski uređaj *iSED Alcor Scientific*

Brzinu sedimentacije eritrocita moguće je odrediti na automatskom uređaju *iSED Alcor Scientific* koji radi na principu fotometrije.

Postupak analize uzorka: Uzorak venske krvi izvadi se u *Vacutainer* epruветu s ljubičastim čepom u kojoj se nalazi antikoagulans etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA). Epruveta se stavlja izravno u kotačić za miješanje s barkodom usmjerenim prema desno, pritom se oglašava zvučni signal očitavanja epruvete. Također, moguće je analizirati uzorke bez barkoda, no tada se ručno, pomoću tipkovnice, unose osobni podaci pacijenta. Uređaj automatski miješa, očitava i odlaže uzorak. Početkom automatske analize, dok se epruvete vrte u kotačiću, uređaj mjeri agregaciju crvenih krvnih stanica tijekom najkraće faze za sedimentaciju eritrocita poznate kao faza *rouleaux* formacija. Uređaj koristi kvantitativnu protočnu fotometriju kako bi izmjerio sedimentaciju eritrocita. Vrijednosti brzine

sedimentacije izračunaju se praćenjem promjene optičke gustoće uzorka. Mjerenje se odvija u kontroliranim uvjetima. Rezultati su gotovi unutar 20 sekundi, zatim se epruveta s uzorkom izbacuje iz uređaja na predviđeno mjesto za skupljanje uzoraka te se odmah može staviti novi uzorak u uređaj. Rezultati uzorka prikazani su na ekranu i automatski ispisani (Slika 6.).



Slika 6. Uređaj *iSED Alcor Scientific*

4.4. STATISTIČKE METODE

Rezultati dobiveni dvjema analitičkim metodama obrađeni su statističkim programom *MedCalc* (*MedCalc Software*, Mariakerke, Belgium). Normalnost distribucije ispitivanih varijabli provjerena je Kolmogorov-Smirnov testom. Za prikaz aritmetičke sredine i standardne devijacije kod normalne raspodjele, i medijana i interkvartilnog raspona kod nenormalne raspodjele, koristit će se deskriptivna statistika. Za obradu i prikaz dobivenih podataka koristit će se Passing Bablok regresijska analiza te Blandov i Altmanov prikaz podataka. Za prikaz korelacije između Westergren metode i metode na automatskom uređaju rađen je Spearmanov koeficijent korelacije. $P < 0,05$ će predstavljati razinu značajnosti kojom će se ocjeniti značajnost dobivenih rezultata.

5. REZULTATI

5.1. Usporedba dobivenih rezultata brzine sedimentacije eritrocita standardnom Westergren metodom (WG) i metodom na automatskom uređaju *iSED Alcor Scientific* (*iSED*)

Rezultati analize brzine sedimentacije eritrocita dobiveni standardnom Westergren metodom i metodom na automatskom uređaju *iSED Alcor Scientific* prikazani su tablicom 2.

Tablica 2. Rezultati analize brzine sedimentacije eritrocita dobiveni standardnom Westergren metodom i metodom na automatskom uređaju *iSED Alcor Scientific*

Redni broj	Westergren metoda mm/h	<i>iSED Alcor Scientific</i> mm/h
1.	2	9
2.	3	8
3.	10	20
4.	7	25
5.	1	2
6.	3	10
7.	2	2
8.	1	5
9.	6	13
10.	25	25
11.	5	5
12.	5	5
13.	10	10
14.	15	15
15.	2	3
16.	3	6
17.	5	9
18.	7	10
19.	5	2
20.	10	19
21.	9	16

22.	6	7
23.	8	10
24.	21	22
25.	5	5
26.	17	17
27.	4	4
28.	5	8
29.	2	2
30.	10	10
31.	26	28
32.	30	19
33.	87	44
34.	24	17
35.	29	53
36.	22	37
37.	2	2
38.	1	4
39.	2	2
40.	3	3
41.	5	5
42.	1	1
43.	22	28
44.	52	26
45.	20	7
46.	22	13
47.	10	3
48.	20	23
49.	25	20
50.	44	23

Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa ukazuju na statistički značajna odstupanja od normalne raspodjele za rezultate dobivene Westergren metodom ($KS(50) = 0,242$; $P < 0,001$), te za rezultate dobivene *iSED Alcor Scientific* metodom ($KS(50) = 0,191$; $P < 0,001$).

5.1.1. Rezultati usporedbe standardne Westergren metode i metode na automatskom uređaju *iSED Alcor Scientific* pomoću Passing Bablok regresijske analize i koeficijenta korelacije metoda

Rezultati Cusumovog testa linearnosti nisu statistički značajni ($P = 0,100$), čime je ispunjen preduvjet za provedbu Passing Bablok regresijske analize.

Rezultati usporedbe standardne i automatizirane metode za određivanje brzine sedimentacije eritrocita su prikazani tablicom 3.

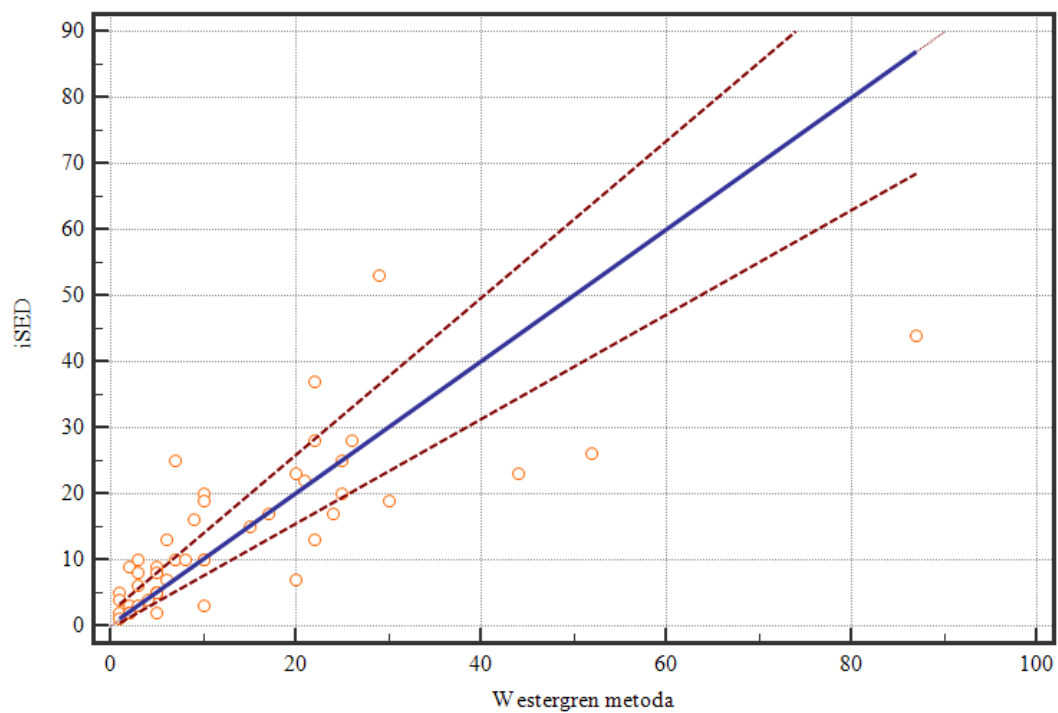
Tablica 3. Prikaz Passing Bablok regresijske analize metoda ($N = 50$)

	<i>iSED</i>	Westergren metoda
Najniža vrijednost	1,0000	1,0000
Najviša vrijednost	53,0000	87,0000
Medijan	10,0000	7,0000
Interkvartilni raspon	4,75 - 20	3 - 21,25

Regresijska jednadžba

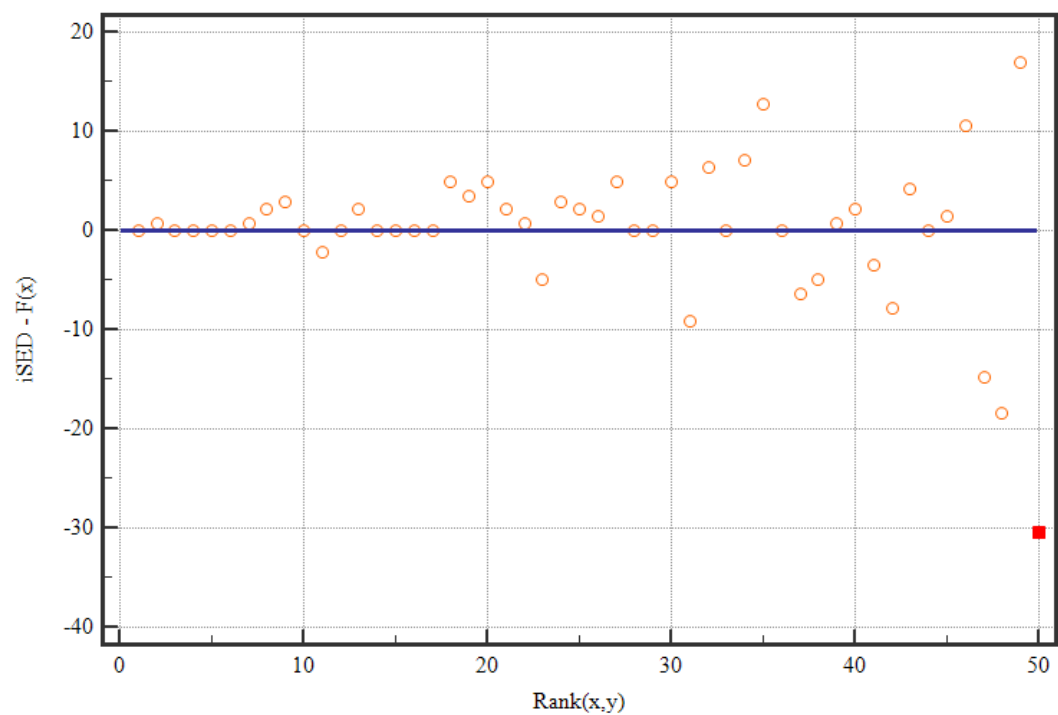
$y = 0,000000 + 1,000000 x$	
Interval pouzdanosti 95% CI za nagib pravca	-2,7368 do 0,3158
Interval pouzdanosti 95% za os x	0,8421 do 1,2632
Linearnost	$P = 0,100$

Iz jednadžbe pravca dobivenog Passing Bablok regresijskom analizom ($y = 0,000000 + 1,000000 x$) vidi se da je koeficijent pravca upravo traženi ($B = 1$) te pravac siječe koordinatni sustav točno u ishodištu ($A = 0$).



Slika 7. Passing Bablok regresijska analiza usporedbe dviju metoda

Pogreška prognoze (rezidual) (Slika 8.) prikazuje variranje rezultata oko pravca u rasponu vrijednosti u kojem s određenom sigurnošću nalazimo predviđene rezultate (uobičajeno 95% CI).



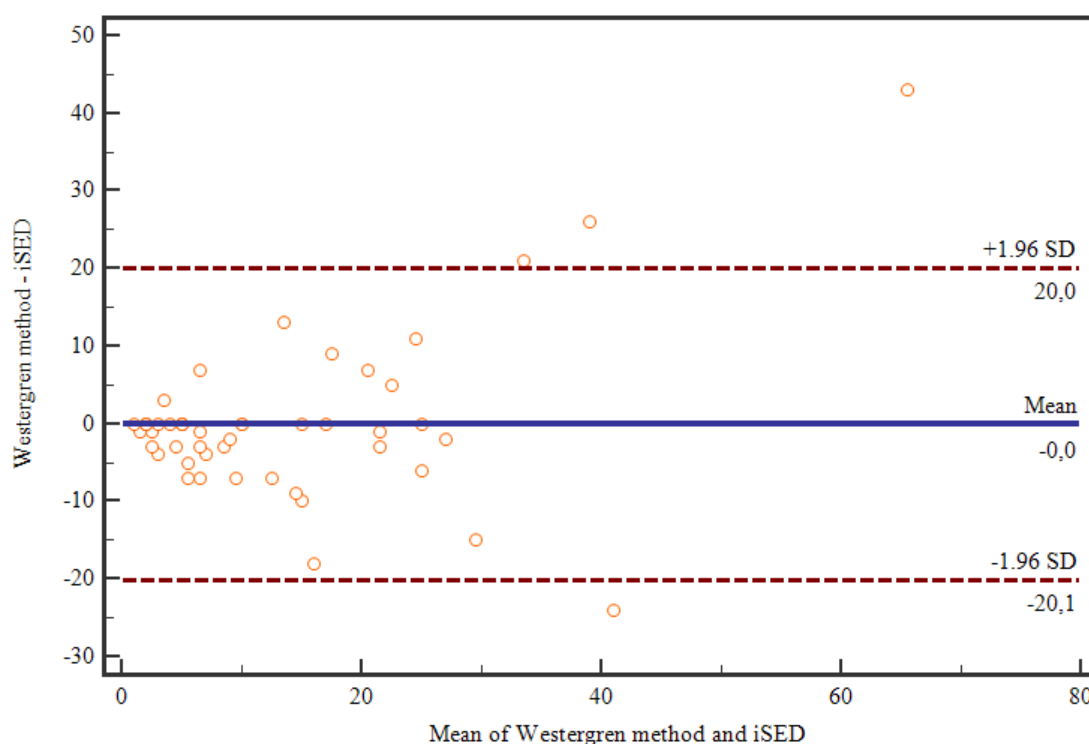
Slika 8. Grafički prikaz rezultata Passing Bablok regresijske analize – reziduali

Spearmanov koeficijent korelacije je visok ($\rho = 0,856$) (Tablica 4.) i značajnost koeficijenta korelacije je $P < 0,001$, što upućuje na postojanje vrlo dobre povezanosti između metode na automatskom *iSED* uređaju i standardne Westergren metode.

Tablica 4. Spearmanov koeficijent korelacije

Koeficijent korelacije	0,856
Značajnost koeficijenta korelacije	$P < 0,001$
95% CI	0,758 do 0,916

Bland Altman prikaz (Slika 9.) prikazuje razliku među dobivenim rezultatima ovisno o metodi koja se koristila u analizi brzine sedimentacije eritrocita. ($N=50$); puna linija predstavlja srednju vrijednost razlike u mjerenjima (-0,0), dok isprekidana linija predstavlja raspon vrijednosti u $\pm 1,96$ SD. Razlike unutar 2 SD nisu klinički značajne. Smatra se da su dvije metode sukladne te međusobno zamjenjive.



Slika 9. Bland Altman prikaz razlike među dobivenim rezultatima mjerenja

6. RASPRAVA

Iako je određivanje stope sedimentacije eritrocita relativno stara hematološka pretraga, i dalje se koristi budući da služi kao nespecifični pokazatelj pri detekciji patoloških stanja. Smatra se da je CRP bolji indikator upala nego brzina sedimentacije, zatim da je osjetljiviji i reagira brže na promjene u organizmu (18). Međutim, CRP služi samo kao pokazatelj akutnih upala, dok je brzina sedimentacije eritrocita lagano povećana i kod kroničnih upalnih stanja. Osobe oboljele od anemije imaju smanjen broj eritrocita u krvi zbog čega je slabije potiskivanje plazme prema gore pa je brzina sedimentacije povećana (14).

U ovom istraživanju uspoređene su dvije metode za određivanje brzine sedimentacije eritrocita: standardna laboratorijska metoda i automatizirana metoda na uređaju *iSED Alcor Scientific*. Usporedbom dviju metoda Passing Bablok regresijskom analizom dobivena je jednadžba pravca ($y = 0,000000 + 1,000000 x$), gdje je koeficijent pravca traženi ($B = 1$) te pravac siječe koordinatni sustav točno u ishodištu ($A = 0$). Na grafičkom prikazu rezultata Passing Bablok regresijske analize reziduala (Slika 8.) prikazano je variranje rezultata oko pravca u rasponu vrijednosti u kojem s određenom sigurnošću nalazimo predviđene rezultate. Tu se može uočiti da se dobivenim višim vrijednostima brzine sedimentacije eritrocita povećava i moguća neusklađenost metoda. Spearmanov koeficijent korelacije ($r = 0,856$) i značajnost koeficijenta korelacije ($P < 0,0001$) ukazuju na izvrsnu korelaciju između metode na *iSED* uređaju i WG metode te rezultat potvrđuje rezultat Passing Bablok metode. Bland Altman prikaz prikazuje razliku između dobivenih rezultata ovisno o metodi koja se koristila u analizi brzine sedimentacije eritrocita. On ukazuje na sukladnost dviju metoda i njihovu međusobnu zamjenjivost.

Prilikom korištenja WG metode može se pojaviti utjecaj raznih tehničkih čimbenika koji dovode do varijacija u rezultatima. Neki od tehničkih čimbenika su prekomjerna količina citrata u epruveti, upotreba heparina umjesto citrata, nepravilan položaj epruvete, promjene u sobnoj temperaturi, nepravilno protresanje epruvete i čuvanje epruvete duže vrijeme. Za razliku od standardne WG metode, koja koristi veliki volumen krvi, automatiziranoj metodi na uređaju *iSED Alcor Scientific* potrebna je mala količina uzorka krvi (100μL, a najmanje 800μL mora biti u epruveti) pa se ovom metodom mogu analizirati i dječji uzorci, no u ovom istraživanju ti uzorci nisu obuhvaćeni. Negativna strana WG metode je i vrijeme potrebno za dobivanje rezultata analize. Visina stupca očitava se nakon jednog sata, dok su rezultati na *iSED* uređaju gotovi već unutar 20 sekundi te se može analizirati 180 uzoraka u jednom satu.

Važna prednost automatizirane metode na *iSED* uređaju je korištenje *Vacutainer* epruveta s EDTA antikoagulansom (ljubičasti čep), budući da se iste koriste prilikom analize krvne slike koja predstavlja rutinski zahtjev uz sedimentaciju. Stoga nije potrebna dodatna epruveta, a i troškovi materijala u laboratoriju su manji. Primjenom automatizirane metode zatvorene epruvete stavljaju se izravno u uređaj, dok se kod WG metode epruvete moraju otvoriti kako bi se umetnula WG skalirana cjevčica. Time je povećan rizik kontaminacije uzorka i infekcije laboratorijskog osoblja, budući da se radi o potencijalno infektivnom materijalu. Također, prije analize brzine sedimentacije eritrocita WG metodom *Vacutainer* epruvetu potrebno je pažljivo ručno promiješati, dok *iSED* uređaj automatski miješa, očitava i odlaže uzorak pod kontroliranim i stalnim uvjetima. *iSED* uređaj ima mogućnost spajanja na informatički sustav pa su dobiveni rezultati prikazani na ekranu ili mogu biti automatski ispisani. Na rezultate dobivene WG metodom može utjecati subjektivna procjena laboratorijskog osoblja. Raspon mjerenja (1-130mm/h) na *iSED* uređaju glavni je nedostatak automatizirane metode. Na vrijednosti dobivene na *iSED* uređaju ne utječu broj i veličina crvenih krvnih stanica te je metoda potpuno automatizirana koristeći barkod te integriran printer (19).

7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se izvesti sljedeći zaključak:

- metoda na automatskom uređaju *iSED Alcor Scientific* je prihvatljiva, usporediva, zamjenjiva i izvrsno korelira sa standardnom Westergren metodom.

8. SAŽETAK

Uvod: Brzina sedimentacije eritrocita nespecifični je pokazatelj prisutnosti akutnih i kroničnih upalnih stanja u ljudskom organizmu. Atomatiziranom metodom na uređaju *iSED Alcor Scientific* moguće je vrlo brzo doći do rezultata. Stoga je važno validirati ovu metodu i omogućiti njezinu svakodnevnu primjenu.

Ciljevi: Ispitati i usporediti vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita dobivene na automatskom uređaju *iSED Alcor Scientific* s vrijednostima dobivenim standardnom laboratorijskom metodom te ustanoviti djelotvornost ispitivanih metoda za određivanje brzine sedimentacije.

Nacrt studije: Presječna studija.

Materijal i metode: U istraživanju su korišteni uzorci pune krvi od 50 pacijenata. Potom su napravljene analize brzine sedimentacije eritrocita. Za analizu Westergren metodom venska krv se prikupljala u *Vacutainer* epruvete u kojima se nalazio antikoagulans natrijev citrat, a za analizu na automatskom *iSED Alcor Scientific* uređaju u epruvete s EDTA antikoagulansom. Dobiveni rezultati su obrađeni pomoću računalnog programa *MedCalc*.

Rezultati: Usporedbom rezultata dobivenih analizom brzine sedimentacije eritrocita pomoću standardne laboratorijske metode i automatizirane metode na uređaju *iSED Alcor Scientific* Cusumovim testom linearnosti, uočljiv je dobar linearan odnos metoda ($P = 0,100$). Passing Bablok regresijska metoda nije pronašla statistički značajne razlike niti sistemskog niti proporcionalnog oblika između promatranih metoda. Spearmanov koeficijent korelacije je visok ($\rho = 0,856$) i značajnost koeficijenta korelacije je $P < 0,001$ te je time dokazano da su metode međusobno usporedive i zamjenjive.

Zaključak: Metoda na automatskom uređaju *iSED Alcor Scientific* za određivanje brzine sedimentacije eritrocita pokazala je izvrsnu podudarnost sa standardnom laboratorijskom metodom te su metode zamjenjive i kompatibilne.

Ključne riječi: *iSED*, sedimentacija eritrocita, validacija, Westergren metoda

9. SUMMARY

VALIDATION OF ERYTHROCYTE *iSED* SEDIMENTATION DEVICE, *ALCOR SCIENTIFIC*

Introduction: Erythrocyte sedimentation rate is a non-specific indicator of the presence of acute and chronic inflammatory conditions in human body. The automatized method on erythrocyte sedimentation device *iSED Alcor Scientific* can quickly get results. It is therefore important to validate this method and allow its everyday application.

Objectives: The goal is to evaluate and compare the values of erythrocyte sedimentation rate obtained on the *iSED Alcor Scientific* automatic device with the values obtained by the standard laboratory method, and establish the effectiveness of the investigated methods for determining sedimentation rate.

Study Design: Cross-sectional study.

Material and Methods: Whole blood samples from 50 patients were used in the study. Then erythrocyte sedimentation rate analyses were performed. For the Westergren method, venous blood was collected in *Vacutainer* tubes that contained anticoagulant sodium citrate, and for analysis on the automatic *iSED Alcor Scientific* device in EDTA anticoagulant tubes. The obtained results were processed using the *MedCalc* computer program.

Results: Comparing the results, obtained by analyzing the erythrocyte sedimentation rate using standard laboratory methods and automated methods on *iSED Alcor Scientific* Cusum test linearity, a good linear relationship of method ($P = 0,100$) is evident. Passing Bablok regression method did not find any statistically relevant differences, neither in systematic or proportional form, between the observed methods. Spearman's correlation coefficient is high ($r = 0.856$) and the correlation coefficient significance is $P < 0.0001$ and therefore, it is proven that the methods are mutually comparable and replaceable.

Conclusion: The *iSED Alcor* method for determining the erythrocyte sedimentation rate showed excellent congruence with the standard laboratory method, meaning the methods are replaceable and compatible.

Keywords: *iSED*, erythrocyte sedimentation, validation, Westergren method

10. LITERATURA

1. IUPAC Technical Report: Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 74, No. 5, pp. 835-855, 2002.
2. Gašljević V. Validacija i mjerna nesigurnost. *Biochemia Medica* 2010;20(1):57-63.
3. NATA: Technical Note #17 – Guidelines for the Validation and Verification of Chemical Test Methods, April 2009.
4. Duletić-Naćinović A, Valković T, Dvornik Š. Hematologija za prvestupnike Medicinsko-laboratorijske dijagnostike. Rijeka: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Fintrade&tours d.o.o. Rijeka; 2011.
5. Suarez-Diez M, Adam J, Adamski J, A.Chasapi S, Luchinat C, Peters A, i sur. Plasma and serum metabolite association networks: comparability within and between studies using NMR and MS profiling. *J Proteome Res.* 2017 Jul 7;2547-2559.
6. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
7. C.Guyton A, E.Hall J. Medicinska fiziologija. 10.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2003.
8. Wu B. MedicalNewsToday. Dostupno na adresi:<https://www.medicalnewstoday.com/articles/314165.php>. Datum pristupa: 23.08.2018.
9. Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY. Platelet activation: the mechanisms and potential biomarkers. *Biomed Res Int.* 2016;2016: 9060143.
10. Flormann DAD. Physical characterization of red blood cell aggregation. *Biological Physics.* 2017.
11. Kumar D, Rizvi SI. Erythrocyte membrane bound and plasma sialic acid during aging. *Biologija* 68/4. 2013;762-765.
12. Hashemi R, Majidi A, Motamed H, Amini A, Najari F, Tabatabaey A. Erythrocyte sedimentation rate measurement using as a rapid alternative to a Westergren method. *Emerg (Tehran).* 2015 Spring;3(2):50-53.
13. Curvers J, Kooren J, Laan M, van Lierop E, van de Kerkhof D, Scharnhorst V, i sur. Evaluation of the Ves-Matic Cube 200 erythrocyte sedimentation method: comparison with Westergren-based methods. *Am J Clin Pathol.* 2010;134:653-660.

14. Litao MKS, Kamat D. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein: how best to use them in clinical practice. *Pediatric Annals*. 2014;43(10):417-420.
15. Holm G, Erickson Gabbey A, Jewell T. Healthline. Dostupno na adresi: <https://www.healthline.com/health/esr>. Datum pristupa: 23.8.2018.
16. Stavljenić Rukavina A, Čvorišćec D, ur. Harmonizacija laboratorijskih nalaza u području opće, specijalne i visokodiferentne medicinske biokemije. Zagreb: Medicinska naklada; 2007.
17. Antoljak N, Biloglav Z, Kolčić I, Gjenero-Margan I, Polašek O, Vorko-Jović A i sur. Epidemiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
18. Harrison M. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein. *Aust Prescr*. 2015; 28:93-4.
19. Predložak za internu proceduru: iSED® Preporučena uputa za korištenje-Automatizirani analizator sedimentacije eritrocita.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Maja Grgurić

Datum i mjesto rođenja:

4. listopada 1996., Osijek

Obrazovanje:

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Osijek

2011. – 2015. II.gimnazija Osijek (Jezična gimnazija)

2003. – 2011. Osnovna škola Višnjevac u Višnjevcu